

Создание коллекции образцов компонентов крови больных множественной миеломой

Гненная Н.В., Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Новикова И.А., Лысенко И.Б., Камаева И.А., Кит О.И.

ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии” Минздрава. Ростов-на-Дону, Россия

Цель. Создание коллекции образцов компонентов крови больных множественной миеломой для потенциальных фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований.

Материал и методы. Материал был собран согласно разработанному алгоритму действий подразделений исследовательских и клинических групп, включающих сбор клинической информации, биологического материала, пробоподготовку, контроль качества биообразцов и хранение в криохранилище биобанка ФГБУ “НМИЦ онкологии” Минздрава России.

Результаты. По данным на август 2021г в криохранилище биобанка ФГБУ “НМИЦ онкологии” Минздрава России содержится коллекция из 175 образцов сыворотки крови, плазмы и моноклеарной фракции крови больных множественной миеломой. Образцы получены от 32 пациентов обоих полов, средний возраст которых $59,5 \pm 1,65$ лет. Для составления электронного каталога были собраны персональные, клинические и лабораторные данные о пациентах, после чего каждому образцу был присвоен свой уникальный идентификационный номер. У всех пациентов были получены письменные информированные согласия на помещение их биоматериала в биобанк с возможностью последующего использования в научных целях. Заморозка полученных образцов осуществлялась в соответствии с протоколом низкотемпературного хранения. В электронном каталоге собран широкий спектр систематизированной клинической и лабораторной информации,

ассоциированный с образцами, представленной в удобной для анализа форме.

Заключение. Коллекция образцов множественной миеломы является уникальным ресурсом для потенциальных исследований патофизиологии заболевания, разработки диагностических биомаркеров и поиска таргетных терапевтических агентов.

Ключевые слова: биобанкирование, множественная миелома, биобанк, биоматериал, онкология, биомаркеры, моноклеарные клетки.

Отношения и деятельность: нет.

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность за активное содействие в работе инженерам отдела эксплуатации медицинского оборудования ФГБУ “НМИЦ онкологии” Минздрава России.

Поступила 03/09-2021

Рецензия получена 08/10-2021

Принята к публикации 19/10-2021



Для цитирования: Гненная Н.В., Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Новикова И.А., Лысенко И.Б., Камаева И.А., Кит О.И. Создание коллекции образцов компонентов крови больных множественной миеломой. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(8):3043. doi:10.15829/1728-8800-2021-3043

Creation of a collection of blood samples of patients with multiple myeloma

Gnennaya N. V., Timofeeva S. V., Sitkovskaya A. O., Novikova I. A., Lysenko I. B., Kamaeva I. A., Kit O. I.
National Medical Research Center of Oncology. Rostov-on-Don, Russia

Aim. To create a collection of samples of blood components of patients with multiple myeloma for potential fundamental and applied biomedical research.

Material and methods. The material was collected according to the developed algorithm, including the collection of clinical information, biological material, sample preparation, quality control and storage in the biobank of the National Medical Research Center of Oncology.

Results. As of August 2021, the cryostorage of the National Medical Research Center of Oncology biobank contains a collection of 175 samples of blood serum, plasma and mononuclear cell fraction of patients with multiple myeloma. Samples were obtained from 32 patients of both sexes, the mean age of which was $59,5 \pm 1,65$ years. To create an electronic catalog, personal, clinical and laboratory data

about patients were collected, after which each sample was assigned its own unique identification number. Written informed consent was obtained from all patients for the storage of their biomaterial in a biobank with possible subsequent use for scientific purposes. Freezing of the obtained samples was carried out in accordance with low-temperature storage protocol. The electronic catalog contains a wide range of systematized clinical and laboratory information on samples.

Conclusion. The collection of multiple myeloma samples is a unique resource for potential research on its pathophysiology, the development of diagnostic biomarkers, and the search for targeted agents.

Keywords: biobanking, multiple myeloma, biobank, biomaterial, oncology, biomarkers, mononuclear cells.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: ngennaya@inbox.ru

Тел.: +7 (928) 614-56-07

[Гненная Н.В.* — м.н.с. лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-3691-3317, Тимофеева С.В. — н.с. лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-5945-5961, Ситковская А.О. — к.б.н., врио зав. лабораторией клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-6035-1756, Новикова И.А. — к.м.н., зам. генерального директора по науке, ORCID: 0000-0002-6496-9541, Лысенко И.Б. — д.м.н., профессор, зав. отделением онкогематологии, ORCID: 0000-0003-4457-3815, Камаева И.А. — врач-онколог отделения онкогематологии, м.н.с. отдела лекарственного лечения опухолей, ORCID: 0000-0003-3001-0675, Кит О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, генеральный директор, ORCID: 0000-0003-3061-6108].

Relationships and Activities: none.

*Corresponding author:
ngnennaya@inbox.ru

Acknowledgments. The authors express their deep gratitude for the active assistance in the work to the engineers of the medical equipment management department of the National Medical Research Center of Oncology.

Received: 03/09-2021
Revision Received: 08/10-2021
Accepted: 19/10-2021

Gnennaya N. V.* ORCID: 0000-0002-3691-3317, Timofeeva S. V. ORCID: 0000-0002-5945-5961, Sitkovskaya A. O. ORCID: 0000-0002-6035-1756, Novikova I. A. ORCID: 0000-0002-6496-9641, Lysenko I. B. ORCID: 0000-0003-4457-3815, Kamaeva I. A. ORCID: 0000-0003-3001-0675, Kit O. I. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

For citation: Gnennaya N. V., Timofeeva S. V., Sitkovskaya A. O., Novikova I. A., Lysenko I. B., Kamaeva I. A., Kit O. I. Creation of a collection of blood samples of patients with multiple myeloma. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(8):3043. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2021-3043

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ММ — множественная миелома, МНК — мононуклеарные клетки периферической крови, МСК — мезенхимальные стволовые клетки, КМ — костный мозг, ЭМ — экстрамедуллярная опухоль спинного мозга, вкДНК — внеклеточная ДНК, ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки.

Введение

Множественная миелома (ММ) — В-клеточная злокачественная опухоль, характеризующаяся мультифокальной пролиферацией неопластических плазматических клеток, которые продуцируют моноклональный иммуноглобулин (Ig). ММ — это второе по распространенности гематологическое злокачественное новообразование в мире с ежегодной заболеваемостью 1% от всех злокачественных опухолей и 10-15% от всех опухолей системы крови [1]. У большинства пациентов ММ характеризуется секрецией Ig, который продуцируется аномальными плазматическими клетками. Однако у 15-20% пациентов клетки ММ секретируют только моноклональные свободные легкие цепи, а у <3% пациентов эти клетки не секретируют моноклональный белок. Клинические и биологические особенности ММ связаны с генетическими aberrациями, такими как перестройка локусов генов тяжелой цепи Ig, мутации соматических генов и хромосомные делеции, хромосомная гиперплоидия с участием нечетного числа хромосом. Всё это обуславливает высокую вариабельность течения болезни [2]. Одной из проблем при лечении ММ является значительная генетическая клональная гетерогенность заболевания. Имеющиеся биомаркеры не учитывают эту особенность ММ, поэтому для лучшего прогнозирования течения заболевания и отслеживания реакции на лечение необходима разработка более совершенных биомаркеров.

В некоторых случаях у пациента отсутствуют признаки активности заболевания, поэтому между временем установки диагноза и определением терапевтической тактики врач вынужден наблюдать пациентов несколько недель и даже месяцев. Потеря времени начала терапии может привести к стремительному развитию осложнений заболевания, затруднению лечения и неэффективности терапии.

Поскольку ММ обладает значимой вариабельностью клинических проявлений и высокой активностью патологического процесса, для принятия решений относительно терапии и лечения

ММ руководствуются показателями биомаркеров [3]. Существует много типов биомаркеров, в общих чертах их можно разделить на молекулярные, гистологические, физиологические или, в некоторых случаях, радиологические [4]. Достижения в терапии за последние два десятилетия улучшили результаты лечения пациентов, в то время как использование новых технологий расширило понимание молекулярных факторов, лежащих в основе возникновения и прогрессирования заболевания [5]. Но, несмотря на их важность и потенциал в лечении ММ, фактическое количество биомаркеров, которые в настоящее время регулярно используются, по-прежнему невелико.

Значительные успехи были достигнуты в понимании молекулярных механизмов развития ММ, что способствовало появлению более сложной классификации, которая включает не только традиционные диагностические критерии, но также иммунофенотип, генетические и молекулярные особенности [6].

Все чаще встречаются исследования по поиску биомаркеров, ассоциированных с различными заболеваниями, где в качестве биоматериала используют коллекции образцов, предоставленные биобанком. Такие коллекции уже содержат клиническую и лабораторную информацию о пациентах, патологии, типах собранных тканей, проверки качества биообразцов и температурных режимах криоконсервации. Например, на базе биобанка Первой дочерней больницы Университета Чжэнчжоу в Китае проводятся исследования, посвященные профилированию метаболизма триптофана у пациентов с сахарным диабетом 2 типа с диабетической гломерулопатией [7].

Salvatore M, et al. (2021) совместно с коллегами, основываясь на данных, полученных из биобанка Великобритании, занимаются фенотипической оценкой риска развития рака поджелудочной железы на ранних этапах [8].

Илларионов Р. А. и др. (2020) на базе биобанка лаборатории геномики с группой биоресурсных

ПИСЬМЕННОЕ СОГЛАСИЕ НА ПЕРЕДАЧУ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ОБРАБОТКУ ПЕРСОНАЛЬНЫХ ДАННЫХ ОПЕРАТОРУ, А ТАКЖЕ — НА ПЕРЕДАЧУ И ПОЛУЧЕНИЕ СВЕДЕНИЙ, СОСТАВЛЯЮЩИХ ВРАЧЕБНУЮ ТАЙНУ.

г. Ростов-на-Дону _____, 20 ____ г.

1. Субъект, дающий согласие на обработку персональных данных, сведений, составляющих врачебную тайну, а также — передающий Оператору биологический материал:

Фамилия, имя, отчество:	
Адрес, тел., e-mail	
Паспорт №:	
Выдан (орган):	
Выдан: (дата / код подразделения):	_____, _____. ____ года, код подразделения: _____ - _____, далее — "Субъект".

✓ принимаю решение о предоставлении моих персональных данных и даю согласие на их обработку свободно, своей волей и в своем интересе, а также — даю согласие на передачу Оператору сведений, составляющих врачебную тайну (в соответствии со статьей 9 федерального закона от 27.06.2006 г. № 152-ФЗ "О персональных данных" и статьей 13 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации");

✓ принимаю решение о безвозмездной, безвозвратной передаче Оператору биологических образцов для проведения научных исследований, государственных заданий в общественно- и социально-полезных целях;

✓ разрешаю хранить и использовать свой биологический материал и данные, связанные с ним (включая результаты лабораторных, патоморфологических, инструментальных и молекулярно-генетических исследований), неограниченное количество времени для научных целей с возможностью передачи обезличенных результатов исследований и биологических материалов Третьей стороне для научно-исследовательской работы, в т.ч. проведения молекулярно-генетических исследований и хранения;

✓ даю согласие на использование результатов исследований всех моих биологических образцов в научных публикациях, при условии, что это не приведет к раскрытию личной информации обо мне.

✓ даю свое согласие ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России на получение информации, содержащей врачебную тайну, у любого врача, у которого я получал консультацию и/или медицинскую помощь или любой организации (страховой медицинской организации, территориального фонда ОМС и других органов власти), обладающей информацией о состоянии моего здоровья. Я уполномочиваю любое медицинское учреждение передавать ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России всю информацию, касающуюся моего здоровья. Я разрешаю любому врачу, любой организации, оказавшей мне медицинскую помощь и обладающей информацией о состоянии моего здоровья, предоставить ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России по его запросу полную информацию о состоянии моего здоровья, включая копию документов.

Наименование и адрес Оператора, получающего согласие Субъекта на обработку персональных данных и сведений, составляющих врачебную тайну, а также на использование биологического материала:

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии" Минздрава России, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63.

Цели обработки персональных данных и сведений, составляющих врачебную тайну: Формирование, сбор, защита, анализ (в т.ч. — клинический биологического материала), статистическая обработка, оценка и синтез данных — базы данных (регистры) лиц с предполагаемым или подтвержденным онкологическим заболеванием (далее также — диагноз, заболевание) с целью изучения и выявления всех значимых аспектов заболевания и его связи с Субъектом, лекарственная и иная терапия (ее аспекты и достигнутые результаты по каждому из методов лечения), статистическая и иная оценка стандартов и подходов, используемых врачами в повседневной клинической практике к диагностике и лечению заболевания с целью улучшения диагностики. Сведения могут быть переданы в государственные учреждения и органы государственной власти (министерство здравоохранения, аппарат президента РФ, аппарат премьер-министра, правительство РФ, государственные учреждения субъектов РФ), для возможного последующего формирования государственных программ в области здравоохранения.

Перечень персональных данных и данных, составляющих врачебную тайну, на обработку которых дается согласие субъекта персональных данных:

Фамилия, имя, отчество; дата рождения; данные документа, удостоверяющего личность; адрес; место рождения, гражданство, семейное положение; пол, контактная информация, номера рабочего и мобильного телефонов, адрес электронной почты, результаты анализов; место жительства; место регистрации; номер полиса ОМС; анамнез; диагноз; сведения об организациях, оказавших медицинские услуги; вид оказанной медицинской помощи; иные значимые сведения, способные пролить свет на динамику заболевания, причину заболевания сведения о результатах диагностики биологического материала, а также — иные значимые сведения.

Перечень действий с персональными данными и данными, составляющими врачебную тайну, на совершение которых дается согласие, общее описание используемых Оператором способов обработки персональных данных:

Обработка данных, включая сбор, систематизацию, классифицирование, накопление, хранение, уточнение (обновление, изменение), использование, анализ, статистическую обработку, распространение, обезличивание (деперсонализацию), блокирование, уничтожение данных.

Перечень действий с биологическим материалом, переданным для вышеуказанных и научных целей:

Проведение всех необходимых лабораторных анализов, хранение образцов в архиве данных и Биобанке "НМИЦ онкологии" с целью проведения дальнейших долгосрочных научных исследований (в т.ч. в рамках государственных заданий).

Настоящее согласие Субъекта Персональных данных действует в течение неопределенного срока. Субъект Персональных данных может отозвать настоящее согласие путем направления Оператору письменного уведомления не менее чем за 90 (девяносто) дней до предполагаемой даты отзыва настоящего согласия.

Настоящее Согласие составлено на одной странице в двух экземплярах — по одному для Оператора и для Субъекта Персональных данных. Настоящее Согласие подписано на русском языке.

Личная собственноручная подпись Субъекта:	
* подтверждающая согласие на безвозмездную и безвозвратную передачу Субъектом Операторам биологического материала Субъекта.	* подтверждающая согласие на обработку Операторами персональных данных Субъекта и сведений, составляющих врачебную тайну.
_____ /расшифровка/ подпись	_____ /расшифровка/ подпись
* отсутствие подписи в соответствующем месте (графе) означает отсутствие согласия на действия Оператора, предусмотренные этой графой, в соответствии с тем, как такие действия указаны выше.	

Рис. 1 Информированное согласие на передачу биологического материала и обработку персональных данных, а также передачу и получение сведений, составляющих врачебную тайну.

коллекций отдела геномной медицины ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" создают коллекцию образцов беременных женщин на разных сроках гестации с целью поиска ранних биомаркеров преждевременных родов. Поскольку сбор биоматериала от женщин на протяжении всей беременности и в родах — крайне сложный процесс, создание подобной коллекции является значимым заданием для будущих фундаментальных и прикладных исследований в области биомедицины [9].

С 1984г по настоящее время в МРНЦ им. А. Ф. Цыба — филиале "НМИЦ радиологии" Минздрава России ведутся работы по формированию клеточного биобанка. В частности, под руководством профессора А. Г. Конопляникова был

проведен ряд экспериментов по изучению введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) лабораторным животным и оценке возможной роли МСК в случае антрациклиновой кардиомиопатии. Полученные результаты позволили разработать внутренний протокол использования МСК при кардиотоксической химиотерапии. Создание клеточного биобанка дает возможность рассматривать метод клеточной терапии как один из перспективных для применения в клинической практике [10].

В настоящее время в России биобанки активно развиваются, о чем свидетельствует создание в 2018г Национальной ассоциации биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО), основной целью которой является объединение специалистов

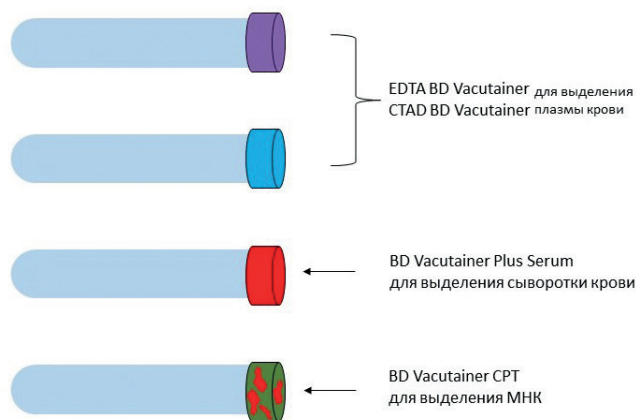


Рис. 2 Пробирки для выделения сыворотки, плазмы и мононуклеарной фракции крови.

РФ в области биобанкирования, а также налаживание взаимодействия с мировым профессиональным сообществом для реализации крупномасштабных исследовательских проектов. В 2019г Биобанк ФГБУ “НМИЦ онкологии” Минздрава России стал одним из членов НАСБИО [11].

Целью настоящей работы было создание на базе биобанка ФГБУ “НМИЦ онкологии” Минздрава России г. Ростова-на-Дону коллекции биобразцов ММ для потенциальных фундаментальных и прикладных исследований в области биомедицины. Бесперебойный доступ к образцам крови больных ММ поспособствует определению конкретных генетических мутаций, которые играют важную роль в патогенезе ММ, что может дать исследователям преимущество в открытии новых стратегических методов лечения пациентов с ММ.

Материал и методы

Биологические образцы и аннотируемые данные собираются для исследования с помощью биобанкирования — процесса, который координируется биобанком. В коллекцию образцов ММ были включены биологические образцы, полученные от пациентов >18 лет с диагнозом ММ, которые проходили лечение в НМИЦ онкологии с 2019г. Отбор больных проводился методом случайной выборки по мере поступления в отделение онкогематологии.

По этическим причинам согласие на участие пациентов является ключевым вопросом. Уважение прав и достоинства пациентов лежит в основе медицинского прогресса. Поэтому в проект были включены только больные, подписавшие информированное согласие на использование их биоматериала в научных целях (рисунок 1).

Объектом исследования была венозная кровь, забор которой проводился утром с 8 до 9 ч, натощак, из локтевой вены в пробирки 4-х типов (рисунок 2).

Для выделения сыворотки крови использовали пробирки BD Vacutainer Plus Serum (красная крышка), на

стенки которых напылен активатор свертывания (кремнезем).

Плазму крови выделяли из пробирок с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) BD Vacutainer, содержащих K₂ЭДТА (сиреневая крышка) и CTAD BD Vacutainer с буферным раствором цитрата, аденозина, теофилина и дипиридамола для стабилизации гепарина в условиях *in vitro*.

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли с применением пробирок BD Vacutainer CPT с антикоагулянтом (цитрат натрия) и разделительной системой гель/Ficoll™. Ficoll™ — сильно разветвленный гидрофильный полисахарид, позволяющий отделить фракцию МНК при центрифугировании. Полиэфирный гель обеспечивает разделение осадка клеток крови от плазмы и МНК и предотвращает их смешивание. Внутренняя поверхность пробирок покрыта силиконом, что позволяет предотвратить неспецифическую активацию клеток.

Для выделения сыворотки и плазмы крови материал в пробирках осаждали в центрифуге ЦЛМН-Р10-01-“Электрон” (Электрон-М, Россия) при 1500 об./мин в течение 15 мин, после чего супернатант отбирали в стерильные криопробирки и замораживали в парах жидкого азота.

Для выделения МНК пробирку центрифугировали. Стандартный принцип метода выделения МНК путем центрифугирования в градиенте фикола-урографина основан на разделении клеточных элементов крови при центрифугировании по плотности, удельная плотность фикола-урографина составляет 1,077 г/см³. Фиколл выступает в роли агрегатора эритроцитов, а урографин необходим для создания плотности 1,077 г/см³ и изотоничности [12]. После центрифугирования происходит разделение крови на 4 фракции: первая фракция содержит эритроциты, тромбоциты и гранулоциты, которые осаждаются на дно пробирки, вторая фракция — фикола-урографин, третья фракция, расположенная непосредственно над фиколлом, представляет собой опалесцирующую мононуклеарную фракцию, в которую входят лимфоциты, субпопуляция моноцитов и бластные гемопоэтические клетки, четвертая фракция — плазма крови (рисунок 3 А). Недостатком такого метода является наличие остаточных сгустков эритроцитов в слое МНК, которые контаминировать выделяемую фракцию. В настоящей работе применяли пробирки с разделительной системой гель/Ficoll™ (рисунок 3 Б), где эритроциты, тромбоциты и гранулоциты проходят не только через градиент плотности, но и под давлением в результате центрифугирования на высоких скоростях продавливаются через разделительный гель, что гарантирует чистоту выделения МНК. Полученные МНК осаждали дважды в стерильном фосфатно-солевом буфере при 1500 об./мин в течение 5 мин и переносили в стерильные криопробирки для дальнейшей криоконсервации в парах жидкого азота.

Все образцы содержатся в криохранилище биобанка при температуре от -65 до -196° С. Диапазон температур отображается на мониторе криогенного резервуара в режиме реального времени и определяется заданными техническими характеристиками.

Регистрация, учет и паспортизация материала осуществляются с использованием таблиц MS Office Excel, а также специализированного программного обеспече-

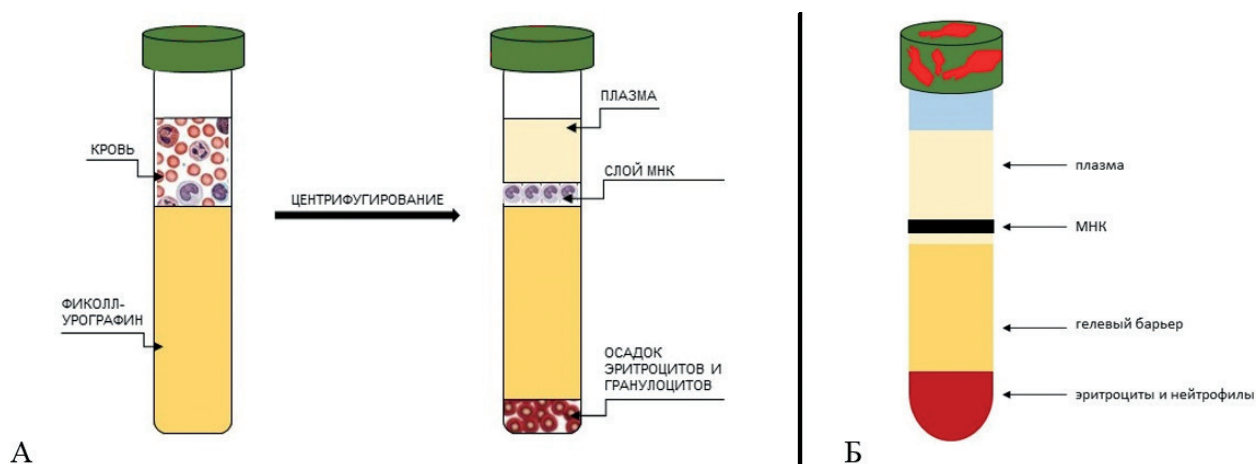


Рис. 3 Разделение периферической крови на фракции: А — получение МНК в градиенте фиколл-урографина; Б — получение МНК в пробирках BD Vacutainer CPT.

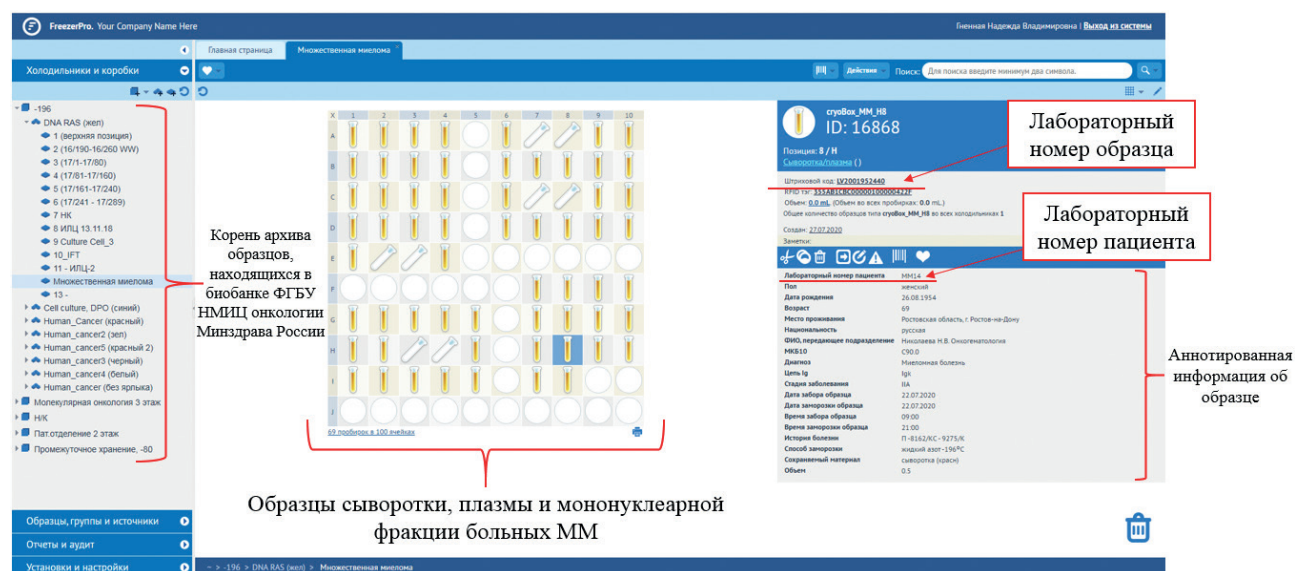


Рис. 4 Пример одной из заполненных форм базы данных в программе FreezerPro.

ния FreezerPRO (RuRo), которое представляет собой визуальную базу данных для учета и хранения информации о биологических образцах (рисунок 4).

Электронный каталог разработан в виде базы данных, в которой содержится информация о полученных образцах. Каждому образцу присвоен уникальный идентификационный номер. Помимо идентификационного номера в каталоге собраны персональные, клинические и лабораторные данные о пациентах, а именно: лабораторный номер пациента, пол, дата рождения, возраст, место проживания, национальность, классификация по международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10), диагноз и стадия заболевания, сопутствующие заболевания, результаты иммунофиксации сыворотки крови, дата забора и заморозки образца. Все персональные данные пациентов помещены в архив с ограниченным доступом.

Результаты

В настоящее время работа по составлению коллекции ММ продолжается. По состоянию на август 2021г в криохранилище биобанка ФБГУ “НИИЦ онкологии” Минздрава России хранится 175 образцов сыворотки крови, плазмы и МНК больных ММ. Образцы были получены от 32 пациентов обоих полов (11 мужчин и 21 женщина) в возрасте 40-79 лет (средний возраст $59,5 \pm 1,65$ лет). Диагноз был установлен на основании данных клинического обследования: спиральная рентгеновская компьютерная томография органов брюшной полости, грудной клетки, малого таза, головного мозга, электрофорез белков сыворотки крови, миелограммы [13]. Разделение пациентов на возрастные группы выполнено согласно клас-

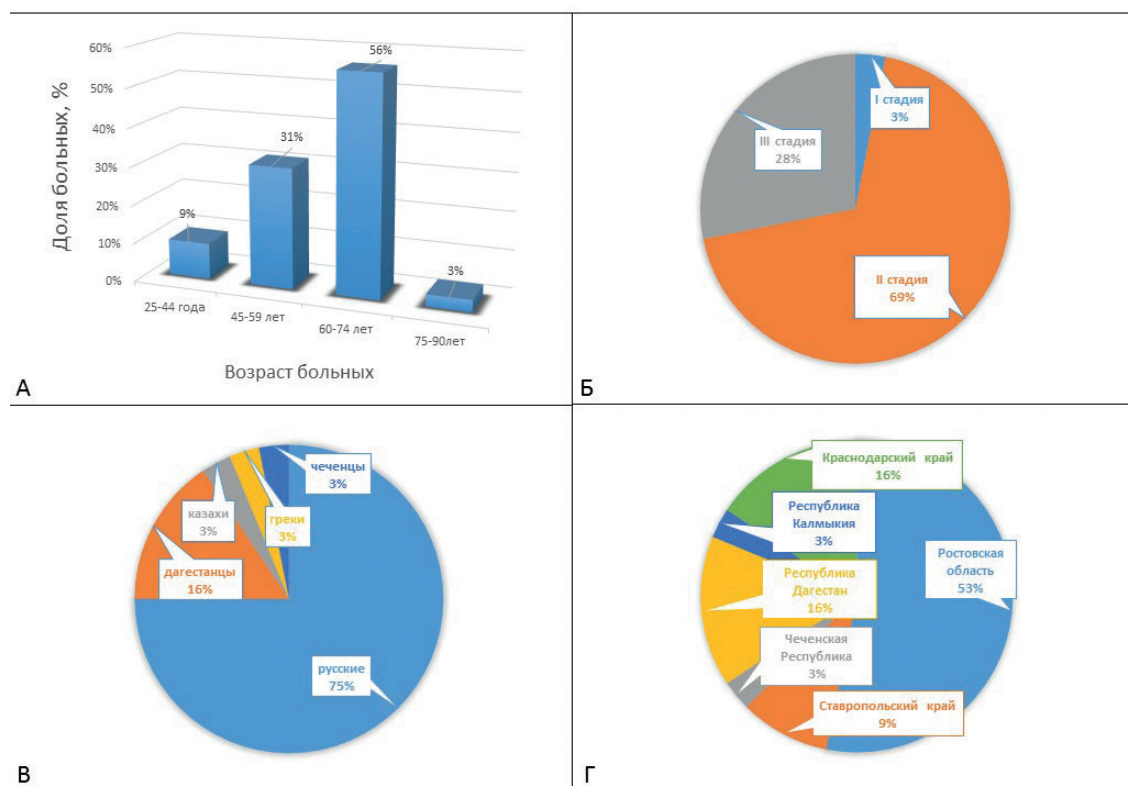


Рис. 5 Распределение пациентов (%): А — по возрастным группам согласно Всемирной организации здравоохранения; Б — по стадиям заболевания ММ; В — по национальной принадлежности; Г — по месту жительства.

сификации Всемирной организации здравоохранения (рисунок 5 А).

На рисунке 5 Б представлено распределение пациентов по стадиям заболевания. Было отмечено, что преобладающее большинство пациентов (69%) поступило со II стадией заболевания, что в 2,5 раза превышало долю больных с III стадией заболевания (28%). Также в выборке присутствует 1 пациент с I стадией ММ.

На рисунке 5 В представлено распределение пациентов по национальной принадлежности. Согласно опросу и визуальной оценке, в выборке преобладали пациенты европеоидного типа. Преобладающая часть больных проживала в Ростовской области (53%), в 3,3 раза меньше в Краснодарском крае (16%) и в Республике Дагестан (16%), остальные — в Республике Калмыкия (3%), Чеченской республике (3%) и Ставропольском крае (9%) (рисунок 5 Г). При этом стоит отметить, что ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России консультирует, обследует и лечит в основном жителей 15 территориальных образований Южного и Северо-Кавказского федеральных округов.

Обсуждение

Для прогнозирования риска прогрессирования бессимптомной («тлеющей») ММ (М-градиент в сыворотке ≥ 30 г/л или в моче > 500 мг/24 ч и/или

клональные плазмциты в костном мозге (КМ) 10-60%, отсутствуют критерии органного поражения, ассоциированного с миеломной болезнью (CRAB), и опухолевый биомаркер SLiM, без первичного AL-амилоидоза) становится актуальной генетическая характеристика [14], которая является фундаментальным прогностическим фактором выживаемости при активной ММ [15]. Для генетического скрининга пациенты проходят многократную аспирацию КМ, что, помимо болезненности процедуры, может быть не полностью репрезентативным из-за очагового поражения КМ, пространственной гетерогенности генома или экстрамедуллярной опухоли (ЭМ). Многорегиональное секвенирование КМ из верхней части заднего гребня подвздошной кости и очаговых поражений в работе Rasche L, et al. (2017) у $> 75\%$ пациентов показало пространственную геномную гетерогенность [16]. В связи с этим растет интерес к альтернативным стратегиям мониторинга генетического ландшафта медуллярных и ЭМ опухолевых плазматических клеток.

Жидкостная биопсия — анализ клеток или клеточных продуктов, выделяемых опухолями в периферическую кровь, является минимально инвазивным подходом для мониторинга генетических изменений. В результате апоптоза или некроза опухолевых и нормальных клеток, в большей части из гемопоэтических, происходит высвобождение

внеклеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (вкДНК); вкДНК опухолевого происхождения в зависимости от типа и стадии опухоли может присутствовать в очень низких концентрациях [17].

Интересно, что при таргетном секвенировании вкДНК при ММ были получены результаты, по большей части совпадающие с теми, что были получены в исследованиях аспирата КМ [18, 19]. Причиной этого может являться высокая генетическая гетерогенность ММ между пациентами и в каждом отдельном случае [20]. Не стоит исключать и возможность того, что изменение числа копий может являться краеугольным камнем прогнозирования на генетической основе [21]. Полноэкзомное секвенирование вкДНК при ММ в исследовании Manier S, et al. (2018) дало информацию о генетических профилях и показало их высокую схожесть с аспиратами КМ, но ограничивалось применением у <25% пациентов с данным заболеванием (при циркулирующей опухолевой ДНК $\geq 10\%$ от общей вкДНК) [22]. Следовательно, существует необходимость альтернативных стратегий для всесторонней неинвазивной генетической характеристики ММ.

В работе Ravi G, et al. (2021) указали, что средний возраст пациентов с ММ на момент постановки диагноза составляет 66–70 лет [23]. Nandakumar B, et al. (2019) проводили исследование по оценке выживаемости пациентов с диагнозом ММ, в котором приняли участие 3449 человек с вышеуказанным диагнозом, поставленным в период 2004–2017 гг. Средний возраст пациентов составлял 64 года [24].

Исследование Razavi P, et al. (2019) показало, что подавляющее большинство мутаций вкДНК имеют особенности, соответствующие клональному гематопоезу [25], что подчеркивает важность секвенирования вкДНК при отсутствии опухолевых клеток или ДНК зародышевой линии, например, Т-клеток.

Одной из альтернативных стратегий для неинвазивной генетической характеристики ММ может быть применение циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) [26], количество которых в ПК является прогностически значимым у пациентов с моноклональной гаммапатией неопределенного значения, бессимптомной и активной ММ [27, 28]. ЦОК обеспечивают прямую оценку ДНК опухоли и, несмотря на минимальную доступность материала из-за низкой чистоты сортировки с помощью иммуномагнитных шариков CD138, продемонстрировали высокую согласованность между генетическими изменениями в образцах циркулирующей опухолевой ДНК, ЦОК и КМ от 4-х пациентов. Однако в исследовании Mishima Y, et al. (2017) при сравнении данных мутационного профиля ЦОК и опухолевых клеток КМ от 8-и пациентов с ММ были получены противоречивые ре-

зультаты [29]. Наконец, в сравнительно недавней работе Garces JJ, et al. (2020) было определено, что примерно 2/3 всех вариантов и большинство ММ-рекуррентных мутаций являются общими для опухолевых клеток КМ и ЦОК. Интересно, что некоторые из них были клональными в одном образце, но субклональными в другом, что предполагает транспортировку опухолевых клеток из отдаленных участков КМ (или ЭМ), которые могут не нести эти мутации или иметь их на субклональных уровнях [30].

Поиск новых биомаркеров ММ остается актуальной проблемой, поэтому необходимо провести исследование различного биоматериала, доступ к которому выполняется наименее инвазивным и травматичным способом. Кроме того, по опыту, выделение ЦОК, изучение которых вызывает огромный интерес, возможно на градиенте плотности $1,077 \text{ г/см}^3$ в слое с МНК. Вероятно, аспираты КМ продолжают оставаться золотым стандартом для генетической характеристики пациентов с ММ. Однако, если неинвазивный скрининг станет возможным, широко применимым и даст прогностически значимую информацию, его можно будет рассматривать как дополнительный подход к стратификации больных, позволяющий хотя бы частично избежать аспирации КМ в течение клинического курса у некоторых пациентов.

Заключение

Идентификация биомаркеров при ММ чрезвычайно важна для снижения затрат на терапию и для повышения чувствительности молекулярного мониторинга, позволяющего на ранней стадии идентифицировать группы риска с точки зрения неэффективности лечения или плохого прогноза. Отсутствие доступа к нужным биообразцам — серьезная проблема. Совершенствование механизмов, обеспечивающих надлежащий и эффективный доступ исследователей при сохранении целостности клинических архивов и соблюдение требований, установленных потребностями клиницистов, имеет решающее значение. Благодаря накопленному опыту проведения работ, а также стандартизации отчетности, Биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России служит ценным ресурсом для обеспечения исследований в области разработки новых предиктивных молекулярных маркеров.

Результатом проделанной работы служит коллекция из 175 образцов сыворотки крови, плазмы, фракции моноклеарных клеток периферической крови больных ММ. Проведена паспортизация образцов с указанием дополнительной информации о месте проживания, национальности, диагнозе и стадии заболевания, а также сопутствующей патологии. Данные биообразцы послужат материалом для дальнейших фундаментальных исследований.

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность за активное содействие в работе инженерам отдела эксплуатации медицинского оборудования ФГБУ “НМИЦ онкологии” Минздрава России.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet*. 2021;397(10272):410-27. doi:10.1016/S0140-6736(21)00135-5.
2. Kumar S, Rajkumar V, Kyle R, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17046. doi:10.1038/nrdp.2017.46.
3. Went M, Sud A, Försti A, et al. Identification of multiple risk loci and regulatory mechanisms influencing susceptibility to multiple myeloma. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-10. doi:10.1038/s41467-018-08107-8.
4. Menetski JP, Hoffmann SC, Cush SS, et al. The Foundation for the National Institutes of Health Biomarkers Consortium: Past Accomplishments and New Strategic Direction. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105:829-43. doi:10.1002/cpt.1362.
5. Pawlyn C, Davies FE. Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood*. 2018;133:7660-75. doi:10.1182/blood-2018-09-825331.
6. Bhutani M, Landgren O, Usmani SZ. Multiple myeloma: is it time for biomarker-driven therapy? *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*. 2015;e493-503. doi:10.14694/EdBook_AM.2015.35.e493.
7. Zhang F, Guo R, Cui W, et al. Untargeted serum metabolomics and tryptophan metabolism profiling in type 2 diabetic patients with diabetic glomerulopathy. *Ren Fail*. 2021;43(1):980-92. doi:10.1080/0886022X.2021.1937219.
8. Salvatore M, Beesley LJ, Fritsche LG, et al. Phenotype risk scores (PheRS) for pancreatic cancer using time-stamped electronic health record data: Discovery and validation in two large biobanks. *J Biomed Inform*. 2021;113:103652. doi:10.1016/j.jbi.2020.103652.
9. Illarionov RA, Kosyakova OV, Vashukova ES, et al. Collection of samples from women at different stages of pregnancy to search for early biomarkers of preterm birth. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2708. (In Russ.) Илларионов Р.А., Косякова О.В., Васькова Е.С. и др. Особенности создания коллекции образцов беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров преждевременных родов. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2708. doi:10.15829/1728-8800-2020-2708.
10. Gritsova LY, Popovkina OE, Dukhova NN, et al. Cell biobank as a necessary infrastructure for the development and implementation of mesenchymal stem cell-based therapy in the treatment of anthracycline-induced cardiotoxicity. Literature review and own data. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2733. (In Russ.) Гривцова Л.Ю., Поповкина О.Е., Духова Н.Н. и др. Клеточный биобанк как необходимая инфраструктура для разработки и внедрения клеточной терапии на основе мезенхимальных стволовых клеток в комплексном лечении антрациклиновой кардиотоксичности. Обзор литературы и собственные данные. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2733. doi:10.15829/1728-8800-2020-2733.
11. Drapkina OM. Russian National Association of Biobanks and Biobanking Specialists — a tool for integrating Russian biobanks and increasing the efficiency of biomedical research. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2757. (In Russ.) Драпкина О.М. Российская “Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию” — инструмент интеграции российских биобанков и повышения эффективности биомедицинских исследований. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2757. doi:10.15829/1728-8800-2020-2757.
12. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968;21(97):1-9.
13. Zuderman NE, Ushakova ND, Lysenko NB, et al. Experience with the use of selective plasma exchange in patients with newly detected secreting multiple myeloma. *Alexander Saltanov Intensive Care Herald*. 2019;2:98-104. (In Russ.) Зудерман Н.Е., Ушакова Н.Д., Лысенко И.Б. и др. Опыт применения селективного плазмообмена у больных первично выявленной секретирующей множественной миеломой. *Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова*. 2019;2:98-104. doi:10.21320/1818-474X-2019-2-98-104.
14. Rajkumar S, Gupta V, Fonseca R, et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27:1738-44. doi:10.1038/leu.2013.86.
15. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33;26:2863. doi:10.1200/JCO.2015.61.2267.
16. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017;8:268. doi:10.1038/s41467-017-00296-y.
17. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:223-38. doi:10.1038/nrc.2017.7.
18. Kis O, Kaedbey R, Chow S, et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun*. 2017;8:15086. doi:10.1038/ncomms15086.
19. Mithraprabhu S, Khong T, Ramachandran M, et al. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia*. 2017;31:1695-705. doi:10.1038/leu.2016.366.
20. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997. doi:10.1038/ncomms3997.
21. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132:587-97. doi:10.1182/blood-2018-03-840132.
22. Manier S, Park J, Capelletti M, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2018;9:1691. doi:10.1038/s41467-018-04001-5.
23. Ravi G, Gonsalves WL. Current Diagnosis, Risk Stratification and Treatment Paradigms in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;100444. doi:10.1016/j.ctarc.2021.100444.
24. Nandakumar B, Binder M, Dispenzieri A, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma (MM) including

- high-risk patients. *J Clin Oncol*. 2019;37:8039. doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.8039.
25. Razavi P, Li BT, Brown DN, et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med*. 2019;25:1928-37. doi:10.1038/s41591-019-0652-7.
26. Garcés JJ, Simicek M, Vicari M, et al. Transcriptional profiling of circulating tumor cells in multiple myeloma: a new model to understand disease dissemination. *Leukemia*. 2020;34:589-603. doi:10.1038/s41375-019-0588-4.
27. Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, et al. High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27:680-85. doi:10.1038/leu.2012.237.
28. Gonsalves WL, Rajkumar SV, Gupta V, et al. Quantification of clonal circulating plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma: implications for redefining high-risk myeloma. *Leukemia*. 2014;28:2060-5. doi:10.1038/leu.2014.98.
29. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Garcés JJ, et al. Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC). *Blood Cancer J*. 2018;8:117. doi:10.1038/s41408-018-0153-9.
30. Garcés JJ, Bretones G, Burgos L, et al. Circulating tumor cells for comprehensive and multiregional non-invasive genetic characterization of multiple myeloma. *Leukemia*. 2020;34:3007-18. doi:10.1038/s41375-020-0883-0.